

# Glycoproteins, process for their preparation and pharmaceutical compositions containing them

**Publication number:** DE4311580

**Publication date:** 1994-08-18

**Inventor:** REUTTER WERNER PROF DR MED (DE); SCHUELER CORA DIPL BIOL (DE); KEPPLER OLIVER (DE); PAWLIKA MICHAEL DR MED (DE); KAYSER HOLGER DIPL CHEM (DE)

**Applicant:** REUTTER WERNER PROF DR MED (DE)

**Classification:**





**- international:** *A61K38/00; A61P9/00; A61P9/08; A61P31/04; A61P31/12; A61P33/02; A61P35/00; A61P37/04; C07K2/00; C07K14/00; C12P21/00; C12R1/91; A61K38/00; A61P9/00; A61P31/00; A61P33/00; A61P35/00; A61P37/00; C07K2/00; C07K14/00; C12P21/00; A61K38/00; (IPC1-7): C07K15/14; A61K37/02*

**- European:** C07K2/00; C12P21/00B

**Application number:** DE19934311580 19930412

**Priority number(s):** DE19934311580 19930412

**Also published as:**

 WO9424167 (A1)  
 EP0646132 (A1)  
 EP0646132 (A0)  
 EP0646132 (B1)

**Report a data error here**

## Abstract of DE4311580

The invention relates to glycoproteins, process for their preparation, pharmaceutical compositions containing them for stimulating growth and differentiation of human and animal cells of the immune system and for preventing adhesion of leucocytes, platelets and tumour cells to vascular endothelial cells; and for stimulating the immune system, in particular T lymphocytes, to defend against infection, to treat immunodeficiency, oncoses, including metastatic processes, infectious diseases (viruses, bacteria, parasites, protozoa) and circulatory failure, especially vascular occlusions and septicæmias in humans and animals.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK**  
**DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES**  
**PATENTAMT**

⑫ **Patentschrift**  
⑩ **DE 43 11 580 C 1**

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 07 K 15/14**  
A 61 K 37/02

⑳ Aktenzeichen: P 43 11 580.2-41  
㉑ Anmeldetag: 12. 4. 93  
㉒ Offenlegungstag: —  
㉓ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 18. 8. 94

**DE 43 11 580 C 1**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ **Patentinhaber:**

Reutter, Werner, Prof. Dr.med., 14195 Berlin, DE

⑦④ **Vertreter:**

Hartmann, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
81679 München

⑦② **Erfinder:**

Reutter, Werner, Prof. Dr.med., 1000 Berlin, DE;  
Schüler, Cora, Dipl.-Biol., O-1071 Berlin, DE;  
Keppler, Oliver, 6900 Heidelberg, DE; Pawlika,  
Michael, Dr.med., 6925 Eschelbronn, DE; Kayser,  
Holger, Dipl.-Chem., 1000 Berlin, DE

⑤⑥ **Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:**

Cancer Res. 48, S. 589-601, 1988;

⑤④ **Glycoproteine, Verfahren zu ihrer Herstellung und sie enthaltende pharmazeutische Mittel**

⑤⑦ Die Erfindung betrifft neue Glycoproteine, Verfahren zu ihrer Herstellung, sie enthaltende pharmazeutische Mittel zur Stimulierung des Wachstums und der Differenzierung von menschlichen und tierischen Zellen des Immunsystems und zur Verhinderung der Adhäsion von Leukozyten, Thrombozyten und Tumorzellen an Gefäßendothelzellen; sowie zur Stimulierung des Immunsystems, insbesondere von T-Lymphozyten, zur Infektabwehr, zur Behandlung von Immunschwäche, Tumorerkrankungen einschließlich Metastasierungsprozessen, Infektionserkrankungen (Viren, Bakterien, Parasiten, Protozoen) und Kreislaufversagen, insbesondere Gefäßverschlüssen und Septikämien, bei Mensch und Tier.

**DE 43 11 580 C 1**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue (Neo)Glycoproteine der nachstehend angegebenen allgemeinen Formeln (I) und (I'), Verfahren zu ihrer Herstellung und sie enthaltende pharmazeutische Mittel zur Stimulierung des Wachstums und der Differenzierung von menschlichen und tierischen Zellen des Immunsystems und zur Verhinderung der Adhäsion von Leukozyten, Thrombozyten und Tumorzellen an Gefäßendothelzellen; zur Stimulierung des Immunsystems, insbesondere von T-Lymphozyten, zur Infektabwehr, zur Behandlung von Immunschwächen, Tumorerkrankungen einschließlich Metastasierungsprozessen, Infektionserkrankungen (Viren, Bakterien, Parasiten, Protozoen) und Kreislaufversagen, insbesondere Gefäßverschlüssen und Septikämien, bei Mensch und Tier; zur Hemmung der Bindung eines Liganden an seinen sialylierten Zelloberflächenrezeptor; zur Hemmung der Bindung eines mikrobiellen Pathogens (Virus, Bakterium, Parasit, Protozoon) oder Toxins an die Wirtszelle über einen sialylierten Rezeptor durch in vivo-Modulation von Neuraminsäuren; zur biosynthetischen Herstellung von Liganden oder Rezeptoren mit modifizierter Neuraminsäure und Verwendung derselben zur Kompetition physiologischer oder pathologischer Ligand-Rezeptor-Interaktionen; zur in vitro-Beeinflussung des Infektionsverlaufs humaner Immundefizienz-Viren (z. B. HIV-1 und HIV-2) sowie zur in vivo-Prävention der Infektion humaner Immundefizienz-Viren (z. B. HIV-1 und HIV-2); und zur Behandlung von parasitären Erkrankungen, insbesondere von Trypanosomiasen, Leishmaniasen, Trichomoniasis, Giardiasis, Amöbiasis, Malaria, Pneumozystose, Schistosomiasis (Bilharziose) und Echinokokkose.

Als Glycoproteine werden Proteine bezeichnet, die kovalent gebundene Kohlenhydrate enthalten. In tierischen Organismen kommen Glykoproteine als wesentliche Bestandteile von Zellmembranen sowie als lösliche Komponenten von Körperflüssigkeiten und der extrazellulären Matrix vor. Die Kohlenhydrate sind zu Ketten verknüpft (Oligosaccharide) und können auf unterschiedliche Weise mit dem Proteingerüst verknüpft sein. Sie enthalten als wichtige Bestandteile der Zellmembran Sialinsäure (Derivate der 2-Keto-3-desoxy-D-glycero-D-galacto-nonulopyranosidonsäure (KDN)), der eine bedeutende Rolle bei biologischen Prozessen zukommt.

Aufgrund ihres Bindungstyps werden die Oligosaccharide unterschiedlichen Gruppen zugeordnet. Die Oligosaccharide von Säugetierglycoproteinen sind am häufigsten N-glycosidisch an einen Asparaginstoffrest der Polypeptidkette gebunden (N-Glycane). In dieser Gruppe finden sich einerseits sezernierte Glykoproteine mit unterschiedlichen Funktionen, z. B. lösliche Enzyme, Immunglobuline und Hormone, andererseits Membranglycoproteine, z. B. Membranenzyme, Transportproteine sowie Rezeptorproteine. Eine weitere Gruppe bilden die O-glycosidisch über einen Galactose-, N-Acetylgalactosamin- oder Xyloserest an einen Serin- oder Threoninrest der Polypeptidkette gebundenen Oligosaccharide (O-Glycane). Sie werden vor allem in Muzinen gefunden, welche die Schleimepithelien des Atem-, Urogenital- und Gastrointestinaltraktes sowie von Tumorzelloberflächen auskleiden. Zusammen mit N-Glycanen kommen sie jedoch auch in Immunglobulinen und anderen Glycoproteinen vor. Zu den O-Glycanen gehören auch die Oligosaccharide der Proteoglycane, die sich durch einen besonders hohen Kohlenhydratanteil auszeichnen. In diesen in der extrazellulären Matrix vorkommenden Glycokonjugaten können die Oligosaccharide über einen Galactose-, N-Acetylgalactosamin- oder Xyloserest an das Polypeptidgerüst gebunden sein.

Die Glycoproteine, bestehend aus Monosacchariden und Eiweiß, werden häufig mit den Glycolipiden als Glycokonjugate zusammengefaßt. Die Zuckerkomponenten der Glycoproteine, die mit wenigen Ausnahmen weniger als 50% des Gesamt-Glycoproteins ausmachen, sind über durch Glycosidasen spaltbare O- oder N-glycosidische Bindungen mit dem Peptidanteil verknüpft. Als Kohlenhydrate finden sich in den Glycoproteinen Hexosen (Galactose, Mannose, seltener Glucose), N-Acetylhexosamine, N-Acylneuraminsäuren, Fucose und andere. Zur Identifizierung und Bestimmung der Glycoproteine eignet sich in erster Linie die Affinitätschromatographie mit pflanzlichen Lectinen als Liganden (z. B. Concanavalin A oder Weizenkeimagglutinin oder andere).

Zu den Glycoproteinen gehören fast alle Membranglycoproteine, Serumproteine, Plasmaproteine, die Blutgruppensubstanzen, viele Enzyme und Proteohormone, alle Antikörper, die Chalone, Muzine, Lectine, Bindine, Fibronectin, der Intrinsic-Faktor und dgl.

Als Membran- oder Oberflächenproteine spielen manche Glycoproteine für die Pathogenität von Viren eine Rolle. Hier wie bei anderen rezeptorspezifischen zellulären Wechselwirkungen sind die Kohlenhydrat-Komponenten für Erkennungsprozesse auf molekularer Ebene verantwortlich.

Über bestimmte Zuckerstrukturen auf Rezeptoren heften einige Bakterien und Viren an ihre Zielzellen an.

Besonders bedeutungsvoll sind Oligosaccharidstrukturen auch im Hinblick auf die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion. So vermitteln die Oligosaccharide von Glycoproteinen die Adhäsion von Neuronzellen und die Bindung von Lymphozyten an spezifische Endothelzellen. Außerdem können Oligosaccharide als antigene Determinanten von Glycoproteinen dienen. Auch während der Embryogenese und der Organogenese sind Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen wesentlich an der spezifischen Zellerkennung beteiligt.

Die maligne Transformation von Zellen wird von charakteristischen Veränderungen der Oligosaccharidstrukturen von Glycoproteinen begleitet. Inwieweit veränderte Oligosaccharidstrukturen von Tumorzellen und Zellglycoproteinen Ursache oder Wirkung der Tumorentstehung und Metastasierung sind, ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt.

In Krankheitsfällen, in denen das Immunsystem beteiligt ist, ist die Unterstützung des Immunsystems durch Verabreichung von Substanzen, die Zellen des Immunsystems stimulieren, erforderlich. Die Suche nach Wirkstoffen zur Stimulierung des Immunsystems ist daher ein vordringliches Ziel pharmakologischer Forschung. Wirkungsvolle Immunstimulantien mit möglichst wenig Nebenwirkungen sind aber bisher nicht bekannt.

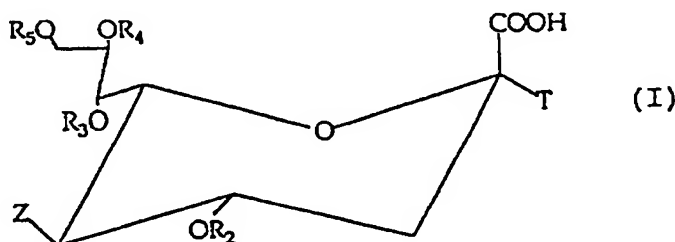
Aufgabe der Erfindung war es daher, Substanzen zu finden, mit deren Hilfe es möglich ist, wirkungsvoll und spezifisch das Immunsystem zu stimulieren.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß diese Aufgabe erfindungsgemäß gelöst werden kann mit neuen

(Neo)Glycoproteinen der nachstehend angegebenen allgemeinen Formeln (I) und (I'). Sie haben eine proliferationsstimulierende Wirkung auf tierische und menschliche Zellen des Immunsystems.

Gegenstand der Erfindung sind neue (Neo)Glycoproteine der nachstehend angegebenen allgemeinen Formeln (I) und (I'):

(Neo)Glycoproteine der allgemeinen Formel (I)



worin bedeuten:

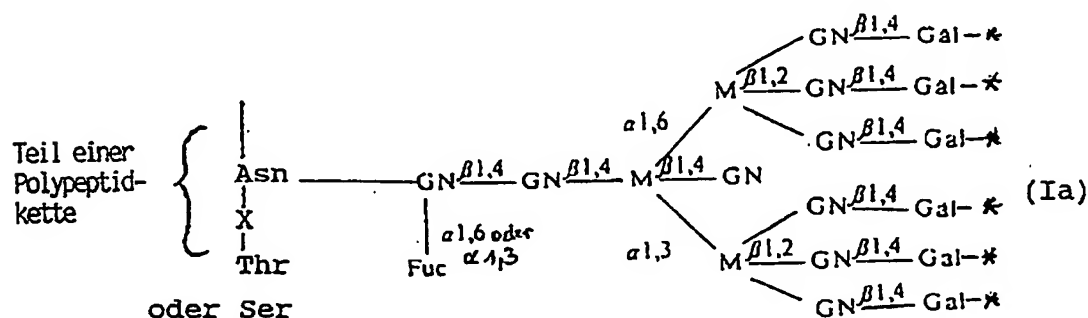
$-R_1$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR_1$ ,  $-NR_1R_1'$ ,  $-N^+R_1R_1'R_1''$ ,  $-OR_1$ ,  $-SR_1$  oder  $-CR_1R_1'R_1''$

$R_1$ ,  $R_1'$ ,  $R_1''$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  und  $R_5$ , die gleich oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoff, einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen ( $C_nH_{2n+2}$ ,  $n=1$  bis 20), vorzugsweise 1 bis 7 Kohlenstoffatomen; einen linearen oder verzweigten Alkenylrest mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen ( $C_nH_{2n}$ ,  $n=3$  bis 20, Position der Doppelbindung an  $C_n$   $n=2$  bis 19), vorzugsweise 3 bis 10 Kohlenstoffatomen; einen linearen oder verzweigten Alkynylrest mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen ( $C_nH_{2n-2}$ ,  $n=3$  bis 20, Position der Dreifachbindung an  $C_n$   $n=2$  bis 19), vorzugsweise 3 bis 10 Kohlenstoffatomen; einen Alkenyl- bzw. Alkynylrest mit 2 oder mehr Doppelbindungen bzw. Dreifachbindungen mit 4 bis 20, vorzugsweise 7 bis 12 Kohlenstoffatomen; einen Arylrest mit 6 bis 20 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise einen Phenylrest; einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Acylrest ( $-CO-R_1$ ) mit insgesamt 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 7 Kohlenstoffatomen einschließlich seiner ein- oder mehrfach hydroxylierten Analoga; einen Aroylrest mit 6 bis 20, vorzugsweise 6 bis 10 Kohlenstoffatomen; einen Carbonylamidrest der Formel  $-CONH_2$ ,  $-CONHR_1$ ,  $-CONR_1R_1'$  oder  $-CONR_1R_1'R_1''$ ; einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Thioacylrest ( $-CS-R_1$ ) mit insgesamt 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 7 Kohlenstoffatomen; oder einen Thiocarbamidrest der Formel  $-CS-NH_2$ ,  $-CS-NHR_1$ ,  $-CS-NR_1R_1'$  oder  $-CS-NR_1R_1'R_1''$ ; wobei jeder der vorgenannten Reste außer H gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert sein kann durch Halogen, insbesondere Fluor, Chlor, Brom oder Jod, Hydroxy-, Epoxy-, Amino-, Mercaptan-, Phenyl-, Phenol- oder Benzylgruppen, und

T einen Mono-, Di- oder Oligosaccharidrest mit bis zu 40 glykosidisch miteinander verknüpften, gegebenenfalls verzweigten Zuckern, die Furanose- und/oder Pyranoseringe darstellen und 5 bis 230 Kohlenstoffatome enthalten und N- oder O-glycosidisch an Polypeptide gebunden sind.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße (Neo)Glycoproteine der vorstehend allgemeinen Formel (I) sind solche, in denen T steht

für einen Saccharidrest mit N-Glycan-Struktur der Formel (Ia)



worin bedeuten:

Gal = Galactose,

GN = N-Acetyl-D-glucosamin,

M = D-Mannose,

Fuc = Fucose,

Asn = Asparagin,

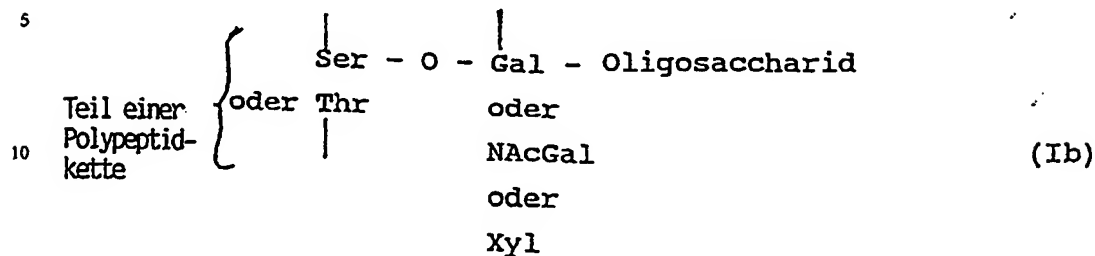
X = eine beliebige Aminosäure außer Prolin,

Thr = Threonin,

Ser = Serin,

\* = T-Verknüpfungsstelle (1 bis 6 Molekülreste)

wobei beide peripheren Reste M durch 1 bis 3 Trisaccharide substituiert sein können; oder für einen Saccharidrest mit O-Glycan-Struktur der allgemeinen Formel (Ib):



15 worin bedeuten:

Gal = Galactose,

Thr = Threonin,

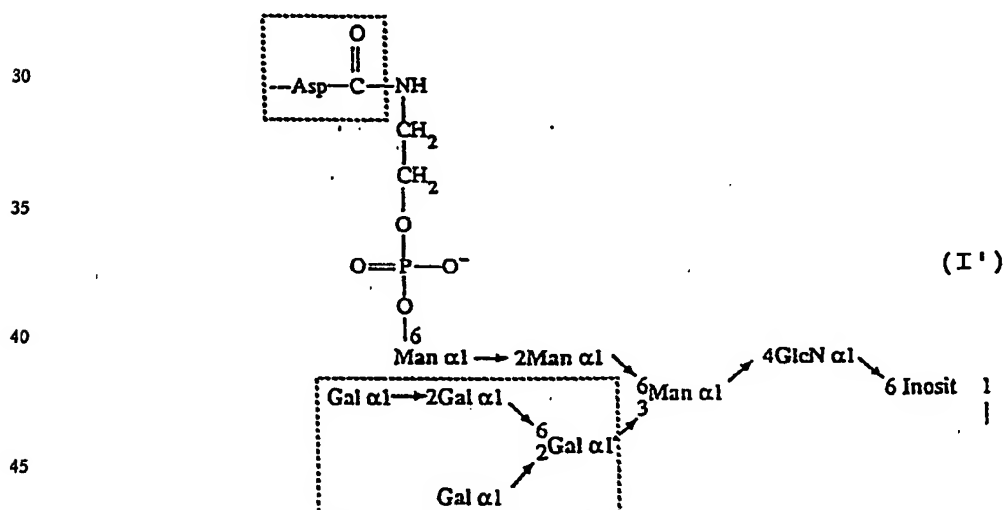
Ser = Serin,

Xyl = Xylose

\* = T-Verknüpfungsstelle,

wobei in den obigen Formeln (Ia) und (Ib) die Galactose (Gal) ersetzt sein kann durch 2-Desoxy-galactose oder 2-Desoxy-2-halogenid (F, Cl, Br, I)-galactose, und

25 (Neo)Glycoproteine der allgemeinen Formel (I') für einen Glycosylphosphatidylinosit(GPI)-Anker



worin bedeuten:

Gal = Galactose,

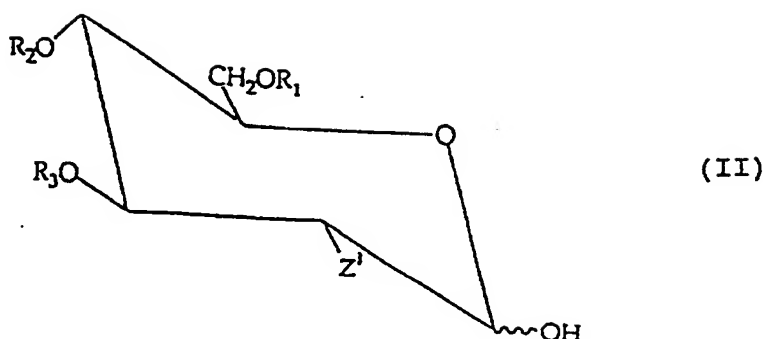
Man = Mannose

Asp = Asparagin

GlcN = Glucosamin

55 wobei GlcN durch Neuraminsäure-Vorstufen-Analogen der nachstehenden Formel II ersetzt sein kann.

Besonders bevorzugte (Neo)Glycoproteine der Erfindung sind solche der Formel (I), in denen dann, wenn T einen Saccharidrest mit N-Glycanstruktur oder einen Saccharidrest mit O-Glycanstruktur darstellt, GN steht für einen Rest der allgemeinen Formel (II):

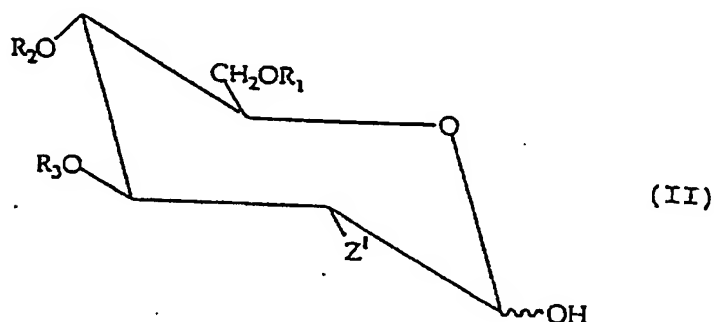


in der  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  die oben angegebenen Bedeutungen haben und  $Z'$  die gleichen Bedeutungen wie  $Z$  hat und neben der äquatorialen Position auch die axiale Position einnehmen kann, und wobei außerdem bei äquatorialer Position von  $Z'$  der Rest  $-OR_2$  in axialer Position stehen kann.

Ganz besonders bevorzugte (Neo)Glycoproteine der Erfindung sind solche, worin  $Z$  bzw.  $Z'$  steht für  $NHR_1$ , worin  $R_1$  den Propanoyl-, Butanoyl-, Pentanoyl-, Hexanoyl-, Heptanoyl- oder Crotonoylrest einschließlich seiner ein- oder mehrfach hydroxylierten Analoga darstellt.

Ganz besonders bevorzugte (Neo)Glycoproteine der Erfindung sind auch solche, in denen  $R_2$  bis  $R_5$  für H oder  $CH_3$  steht.

Die erfindungsgemäßen (Neo)Glycoproteine werden gebildet aus Aminosuckern (Neuraminsäure-Vorstufen-Analoga) der allgemeinen Formel



in der  $Z'$  und  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen haben und die ebenfalls neue Verbindungen darstellen.

Die Aminosucker der allgemeinen Formel (II) und die daraus gebildeten (Neo)Glycoproteine der allgemeinen Formeln (I) und (I') stellen neue Substanzklassen dar, die als potente Wirkstoffe zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden können, an denen Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr, Tumorzellen, Leukozyten, Thrombozyten und Gefäßendothelzellen beteiligt sind. Die Verbindungen können gezielt über eine Modulation Membran-ständiger Rezeptoren wirken, die an der Regulation des Wachstums und der Differenzierung sowie der Adhäsion von Zellen des Immunsystems, von Tumoren und von Gefäßen beteiligt sind. Eine Immunstimulation ist notwendig beim Heilungsprozeß infektiöser und tumorbedingter Krankheiten. Weiterhin verhindern diese Verbindungen die Adhäsion von Leukozyten oder Tumorzellen auf Gefäßendothelzellen bei septischem Schock oder bei der Metastasierung. Die Verabreichung dieser Substanzen, insbesondere der Substanzen der Formel (II), führt zu keinen erkennbaren Nebenwirkungen.

Die erfindungsgemäßen Glycoproteine (I) und (I') sowie die Aminosucker (II), aus denen sie gebildet werden, die neuartige Immunstimulantien darstellen, können als Stimulantien für Zellen des Immunsystems eingesetzt werden. Dadurch ist eine Stärkung des Immunsystems bei immungeschwächten Organismen möglich. Sie zeichnet sich durch hohe Zell-Spezifität und fehlende Nebenwirkungen aus.

Die in den Formeln (I), (I') und (II) genannten Reste werden nachstehend näher erläutert.

Beispiele für die obengenannten Alkylreste mit 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 7 Kohlenstoffatomen sind beispielsweise Propyl-, Butyl-, Pentyl-, Hexyl-, Isopropyl- und Pivalinylreste.

Beispiel für geeignete Alkenylreste sind Propenyl-, But-2-enyl-, But-3-enyl-, Pent-2-enyl- und Pent-3-enyl-Reste.

Beispiele für geeignete Alkenylreste mit mehreren Doppelbindungen sind Pent-2,4-dienyl- und Hex-2,4-dienyl-Reste.

Beispiele für geeignete Substituentengruppen sind Chlorethyl-, Dichlorethyl-, Trichlorethyl-, p-Chlorophenyl-, Hydroxymethyl-, 3-Hydroxypropyl- und p-Hydroxyphenylgruppen.

Die Sialinsäure ist Bestandteil des Glykoproteins (I) bzw. Aminosuckers (II).

Beispiele für langkettige Acylreste sind Caproyl-, Octoyl-, Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Stearoyl-, Oleyl-, Linoleyl-, Linolenoyl- und Arachidonoyl-Reste sowie deren ein- oder mehrfach hydroxylierten Analoga.

Beispiele für geeignete Monosaccharid-, Disaccharid- und Oligosaccharid-Reste sind D-Glucosyl-, D-Galacto-

syl-, D-Mannosyl-, Xylosyl-, Inosyl-, Ribosyl-, Arabinosyl-, Fructosyl-, Sorbosyl-, Lactosyl-, Saccharosyl-, Trehalosyl-, Maltosyl-, Cellobiosyl- und höhere Saccharidreste, wie Raffinosyl-, Fucosyl-, Chitobiosyl-, Chitobiosemanosyl-, Rutinosyl- und Rhamnosyl-Reste. Es sind sowohl 1 $\alpha$ - als auch 1 $\beta$ -Verknüpfungen möglich. Ein oder mehrere Zuckerringe können auch als Zuckerramine wie Glucosamin, Mannosamin und Galactosamin vorliegen.

5 Gegenstand der Erfindung sind ferner Verfahren zur in vivo-Herstellung der Verbindungen der vorstehend angegebenen Formeln (I) und (I') durch parenterale oder enterale Verabreichung einer 2-Desoxy-2-amino-mannose, -glucose oder -galactose, deren Aminogruppe durch R<sub>1</sub> substituiert ist, vorzugsweise von N-Propanoyl-, N-Butanoyl-, N-Pentanoyl-, N-Hexanoyl-, N-Heptanoyl- oder N-Crotonoyl-D-mannosamin, an Mensch oder Tier.

10 Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die in vivo gebildeten Glycoproteine der allgemeinen Formeln (I) und (I') auf an sich bekannte Weise gewonnen (abgetrennt) werden für den therapeutischen Einsatz.

Gegenstand der Erfindung sind ferner pharmazeutische Mittel zur Stimulierung des Immunsystems, insbesondere der T-Lymphozyten, zur Infektabwehr, zur Behandlung von Immunschwächen, Tumorerkrankungen einschließlich Metastasierungsprozessen, Infektionskrankheiten (Viren, Bakterien, Parasiten, Protozoen) und Kreislaufversagen, insbesondere Gefäßverschlüssen und Septikämien, bei Mensch und Tier;

zur Stimulierung des Wachstums und der Differenzierung von menschlichen und tierischen Zellen des Immunsystems und zur Verhinderung der Adhäsion von Leukozyten, Thrombozyten und Tumorzellen an Gefäßendothelzellen;

zur Erhöhung der zytotoxischen Aktivität natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) zur Induktion einer Antitumor-Immunreaktion bei Mensch und Tier;

zur Steigerung der Phagozytose-Fähigkeit von Granulozyten und Monozyten zur Induktion einer Antitumor-Immunreaktion bei Mensch und Tier;

25 zur in vivo-Beeinflussung Neuraminsäure-abhängiger biologischer Prozesse;

zur Hemmung der Ligandenbindung an sialylierte Zelloberflächenrezeptoren (Endothelzellen, Thrombozyten, Leukozyten);

zur Hemmung der Bindung eines mikrobiellen Pathogens (Virus, Bakterium, Parasit, Protozoon) oder Toxins an die Wirtszelle über einen sialylierten Rezeptor durch in vivo-Modulation von Neuraminsäuren;

30 zur Behandlung von parasitären Erkrankungen, insbesondere von Trypanosomiasen, Leishmaniasen, Trichomoniasis, Giardiasis, Amöbiasis, Malaria, Pneumozystose, Schistosomiasis (Bilharziose) und Echinokokkose; die jeweils als Wirkstoff mindestens eine Verbindung der vorstehend angegebenen Formeln (I) und/oder (I') und/oder der Produkte der vorstehend beschriebenen Herstellungsverfahren, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie üblichen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, enthalten.

35 Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel enthalten die erfindungsgemäße Verbindung(en) der Formeln (I) und/oder (I') und/oder die Verfahrensprodukte in einer Menge von 0,01 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise von 0,1 bis 20 Gew.-%, insbesondere von 2 bis 10 Gew.-%, bezogen auf das Gewicht des pharmazeutischen Mittels.

Die Verbindungen der allgemeinen Formeln (I) und/oder (I') und/oder der allgemeinen Formel (II) und/oder der Produkte der vorstehend beschriebenen Herstellungsverfahren sind insbesondere verwendbar

40 zur Stimulierung des Wachstums und der Differenzierung von menschlichen und tierischen Zellen des Immunsystems und zur Verhinderung der Adhäsion von Leukozyten, Thrombozyten und Tumorzellen an Gefäßendothelzellen;

zur Stimulierung des Immunsystems, insbesondere von T-Lymphozyten, zur Infektabwehr, zur Behandlung von Immunschwächen, Tumorerkrankungen einschließlich Metastasierungsprozessen, Infektionserkrankungen (Viren, Bakterien, Parasiten, Protozoen) und Kreislaufversagen, insbesondere Gefäßverschlüssen und Septikämien, bei Mensch und Tier;

zur Hemmung der Bindung eines Liganden an seinen sialylierten Zelloberflächenrezeptor;

zur Hemmung der Bindung eines mikrobiellen Pathogens (Virus, Bakterium, Parasit, Protozoon) oder Toxins an die Wirtszelle über einen sialylierten Rezeptor durch in vivo-Modulation von Neuraminsäuren;

50 zur biosynthetischen Herstellung von Liganden oder Rezeptoren mit modifizierter Neuraminsäure und Verwendung derselben zur Kompetition physiologischer oder pathologischer Ligand-Rezeptor-Interaktionen;

zur in vitro-Beeinflussung des Infektionsverlaufs humaner Immundefizienz-Viren (z. B. HIV-1 und HIV-2);

zur in vivo-Prävention der Infektion humaner Immundefizienz-Viren (z. B. HIV-1 und HIV-2); und

55 zur Behandlung von parasitären Erkrankungen, insbesondere von Trypanosomiasen, Leishmaniasen, Trichomoniasis, Giardiasis, Amöbiasis, Malaria, Pneumozystose, Schistosomiasis (Bilharziose) und Echinokokkose.

Ein wichtiges Anwendungsgebiet der Erfindung ist die in vivo-Beeinflussung durch Neuraminsäure-Vorstufenanaloge der vorstehend angegebenen allgemeinen Formel (II) von Rezeptor-Ligand-Interaktionen, an denen Neuraminsäuren beteiligt sind.

60 Viele biologische Vorgänge beruhen auf der Interaktion von Liganden (beispielsweise Hormone, Interleukine, Pharmaka, Zell-Zell-Erkennung) mit Rezeptoren auf Zelloberflächen. Auch pathogene Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Protozoen) oder deren Toxine benutzen für ihre pathogene Wirkung häufig Zelloberflächenstrukturen als Rezeptoren für die Interaktion mit Wirtszellen. Zell-Zell-Erkennung ist wesentlich beteiligt an physiologischen und pathologischen (z. B. Autoimmunerkrankungen) Funktionen des Immunsystems, bei der Gewebedifferenzierung und bei der immunologischen Kontrolle maligner Tumorzellen.

65 Bei einer Vielzahl dieser Ligand-Rezeptor-Interaktionen sind Kohlenhydrat-Strukturen wesentlich beteiligt. Eine besondere Rolle spielen dabei terminale Neuraminsäuren auf diesen Kohlenhydrat-Strukturen: Beispielsweise benutzt das Influenzavirus einen sialylierten Zelloberflächen-Rezeptor. Zur Aktivierung von T-Lympho-

zyten sind sialylierte Differenzierungsantigene notwendig. Des weiteren ist unterschiedliche Zelloberflächen-Sialylierung als Determinante für Progression und Metastasierung maligner Tumoren beschrieben worden.

Eine Möglichkeit, Neuraminsäure-abhängige biologische Prozesse zu beeinflussen, besteht in der Verwendung nicht-toxischer Neuraminsäure-Vorstufen-Analoga, die von Zellen aufgenommen werden und nach Metabolisierung anstelle von physiologischer Neuraminsäure in Kohlenhydrat-Strukturen eingebaut werden. Die eingeführte Modifikation der Neuraminsäure kann Ligand-Rezeptor-Interaktion abschwächen, verstärken oder unbeeinflusst lassen.

Je Beispiel für Abschwächung bzw. Verstärkung einer Rezeptor-Ligand-Interaktion wird im folgenden beschrieben:

#### A. Reduktion der Infizierbarkeit von humanen B-Lymphomzellen (BJA-B) für das lymphotrope Papovavirus (LPV) durch Vorbehandlung mit N-Propanoyl-D-Mannosamin oder N-Butanoyl-D-Mannosamin.

Der von LPV auf BJA-B-Zellen benutzte Rezeptor ist Neuraminsäure-abhängig, da Behandlung der Zellen mit *Vibrio cholerae* Neuraminidase die Virusbindung und die Infizierbarkeit um mehr als das Fünffache reduziert (eigene unveröffentlichte Ergebnisse).

#### B. Verstärkung der Infizierbarkeit von Affen-Nieren-Epithelzellen (Vero) für das humane Poylomavirus BK (BKV) durch Vorbehandlung mit n-Propanoyl-D-Mannosamin.

Für die Infektion von Vero-Zellen durch BKV ist eine Zelloberflächen-Neuraminsäure wesentlich, da Präinkubation von Vero-Zellen mit Neuraminidase, die Infizierbarkeit reduziert (Sinibaldi et al., Arch. Virol. 113 (1990), 291 – 296).

### Material und Methoden

#### 1. Verwendete Abkürzungen

A Absorption  
 BKV BK Virus  
 DAPI 4',6-Diamidino-2-phyindol  
 DMEM Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium  
 DTT 1,4-Dithiothreitol  
 EBV Epstein-Barr Virus  
 ELISA Enzymgekoppelter Immunosorbent Test  
 FITC Fluoresceinisothiocyanat  
 FKS Fötales Kälberserum  
 LPV Lymphotropes Papovavirus  
 LRSC Lisamin-Rhodamin-Isothiocyanat  
 mAk Monoklonaler Antikörper  
 OD Optische Dichte  
 PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung  
 rpm Umdrehungen pro Minute  
 RT Raumtemperatur  
 SD Standardabweichung  
 SV40 Simian Virus 40  
 TMB Tetramethylbenzidin  
 TRITC Tetra-Rhodamin-Isothiocyanat  
 VP Virales Strukturprotein  
 FACS Fluoreszenz-aktivierter Cellsorter  
 Scan Scanner

#### 2. Zellkulturmedien

Als Zellkulturmedien wurden RPMI 1640 und DMEM Medium verwendet, die von Biochrom, Berlin als Trockensubstanz bezogen wurden. Für den Gebrauch wurden sie nach Herstellerangaben in bidestilliertem, pyrogenfreiem H<sub>2</sub>O aufgenommen und sterilisiert. Zugesezt werden 10% FKS [30 min bei 56°C inkubiert zur Inaktivierung des Komplementsystems], 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

#### 3. Puffer

— PBS:  
 125 mM NaCl (7,2 g); 18,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3,14 g); 10,9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,42 g); H<sub>2</sub>O ad 1 l (pH 7,2)

— "Extraktionspuffer" zur Herstellung von LPV- und BKV-Impfvirus aus infizierten Kulturen:  
 50 mM HEPES pH 7,4; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 2,5 µg/ml Amphotericin B; 200 µg/ml Gentamycin; 200 U/ml Penicillin; 200 µg/ml Streptomycin.  
 DTT, PMSF, Amphotericin B, Gentamycin, Penicillin und Streptomycin werden dem autoklavierten Puffer vor



Gebrauch frisch zugesetzt.

#### 4. Zelllinien

- 5 Die humane B-Lymphom-Zelllinie BJA-B (Menezes et al., Biomedicine 22 (1975), 276—284) wurde als LVP-suszeptile Zelllinie benutzt. Diese Zelllinie ist erhältlich bei der European Collection of Animal Cultures (ECACC), Porton Down, Salisbury (GB), hinterlegt gemäß den Bedingungen des Budapester Vertrags unter der Nummer 86 081 105. Als BKV-suszeptible Zelllinie wurde die Affen-Nieren-Epithelzelllinie Vero benutzt. Diese Zelllinie ist erhältlich bei der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland (USA) unter der  
10 Nummer ATCC CRL 1587.

#### 5. Zellkultur

- 15 Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank (L II) durchgeführt. Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. BJA-B Zellen wurden in Glas-Erlenmeyerkolben mit Aluminiumfoliendeckel kultiviert. Bei einer Dichte von  $2 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml befanden sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Hatten sie eine stationäre Wachstumsphase erreicht, wurden sie mit frischem Medium gefüttert und dabei 1 : 3—1 : 10 verdünnt (Forbes et al., Mol. Cell. Probes 2 (1988), 245—253). Die adhärent wachsenden Monolayer-Zelllinie Vero wurde in Zellkultur-Plastikflaschen gehalten. Bei Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen mit wenigen ml Trypsin-Lösung [0,1% Trypsin; 0,1% EDTA in H<sub>2</sub>O] gespült. Nach kurzem Einwirken von Trypsin bei 37°C lösten sich die Vero Zellen vom Untergrund ab. Dann wurden sie 1 : 3—1 : 20 mit frischem Medium verdünnt (Mühlbach et al., Virology 186 (1992), 65—73).

- 20 Zur Zellkonzentrationsbestimmung wurden 100 µl suspendierter Zellen mit 100 µl Trypanblau-Lösung [0,25% Trypanblau, gelöst in PBS] gemischt und einige Tropfen zwischen Deckglas und Kammer einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Tote Zellen färbten sich blau an und konnten von hell-leuchtenden lebenden Zellen im Lichtmikroskop unterschieden werden. Die Summe der Zellzahlen von zwei der vier Quadranten multipliziert mit  $10^4$  ergab die Zellzahl pro ml der Ausgangskultur.

#### 30 6. Antiseren und monoklonale Antikörper

- Benutzt wurden ein polyklonales Hamster-α-LPV-T-Antigen Serum, ein polyklonales Kaninchen-α-LPV-VP-Serum und monoklonaler Antikörper (mAk) 456-1 aus Maus-Aszites gegen LPV-VP1 von M. Pawlita, Heidelberg; außerdem wurden ein Maus-mAk gegen SV40-T-Antigen (mAk SV1-3H9) von F. Mehnert, Bochum, sowie  
35 ein Kaninchen-Antiserum gegen BKV Partikel von G. Noss, Rehlingen-Siersburg, verwendet.

#### 7. Herstellung von Impfvirus

##### 7.1 Herstellung von LPV-Impfvirus

- 40 Das lymphotrope Papovavirus (LPV) ist bei der American Type Culture Collection unter der Nummer ATCC VR-961 erhältlich. Zu  $2 \times 10^7$  BJAB Zellen in Kultur werden 200—300 µl einer LPV-Impfvirus-Lösung gegeben. Die Kultur wird alle drei Tage 1 : 5 mit frischem Medium expandiert und ab dem 6. Tag wird über indirekte Immunfluoreszenz der Prozentsatz Virus-infizierter Zellen bestimmt; liegt dieser zwischen 30% und 60%, so  
45 wurde die Kultur geerntet. Dazu wurden die Zellen für 15 min bei 600 g abzentrifugiert, in PBS gewaschen und das Zellsediment zur Zellyse bei -20°C eingefroren. Zur Virusextraktion wird das Zellsediment in kaltem "Extraktionspuffer" (1/20 des Zellkulturvolumens) resuspendiert. Die Suspension wird unter häufigem Aufwirbeln (Vortexen) für 60 min auf Eis gehalten, bevor die Zelltrümmer mit 2500 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert werden. Das verbleibende Sediment wird noch dreimal mit 1/60 des ursprünglichen Zellkulturvolumens jeweils  
50 für 5—10 min nachextrahiert. Nachfolgend werden die vier Überstände vereinigt. Durch Titration auf BJA-B Zellen wurde die Infektiosität der LPV-Suspension bestimmt und das Impfvirus bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

##### 7.2 Herstellung von BKV-Impfvirus

- 55 Das humane Polyomavirus BK (BKV) ist bei der American Type Culture Collection unter der Nummer ATCC VR-837 erhältlich. BKV-Impfvirus wurde aus infizierten und für ca. 3 Wochen kultivierten Vero Zellen gewonnen. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und 15 min bei 600 g abzentrifugiert, in PBS gewaschen und das Zellsediment zur Zellyse bei -20°C eingefroren. Das Zellsediment wurde zweimal einem Frieren-Tauen-Vorgang unterzogen und zur Virusextraktion in kaltem "Extraktionspuffer" (1/20 des Zellkulturvolumens) resuspendiert. Die Suspension wurde unter häufigem Aufwirbeln (Vortexen) für 60 min auf Eis gehalten, bevor die Zelltrümmer mit 2500 g rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert wurden. Nachfolgend wurde die Infektiosität des Überstands auf Vero Zellen ausütriert das Impfvirus bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

#### 65 8. Behandlung von Zellen mit Neuraminidasen und nachfolgende Virus-Infektion

- 1,5 × 10<sup>6</sup> BJA-B Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen, 1 h in PBS bei 37°C gehalten und dann mit 20 mU Neuraminidase (von vibrio cholerae) in 1100 µl PBS (0,2 U/ml) auf einem Schüttler für 60 min bei 37°C inkubiert.

Nach einmaligem Waschen (4°C, 400 g, 10 min) in PBS wurden die Zellen erneut mit Neuraminidase (0,2 U/ml) unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nach weiteren 60 min werden die Zellen in kaltem Medium aufgenommen und 10 min bei 4°C und 2600 rpm abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 400 µl einer LPV-Impfvirus-Suspension aufgenommen und bei 4°C für 3 h unter mehrmaligem Aufwirbeln inkubiert. Das nicht-zellgebundene Virus wurde durch einmaliges Waschen mit Medium entfernt und die Zellen nachfolgend in 2 ml frisches Medium aufgenommen und für 48 h kultiviert. 5

Zu ca. 50% konfluent gewachsene Vero Zellen auf Deckgläsern wurden mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben mit Neuraminidase (von *Vibrio cholerae*) für insgesamt 2 h inkubiert. Die Enzymlösung wurde mit Medium abgespült und die Zellen nachfolgend mit BKV-Impfvirus für 3 h bei 4°C infiziert. Nicht zellgebundenes BKV wurde von Vero Zellen durch dreimaliges Spülen mit Medium abgewaschen. Nach 48 h Kultur bei 37°C wurde der Prozentsatz Virus-infizierter Zellen mittels indirekten Immunfluoreszenz bestimmt werden. 10

#### 9. Behandlung von Zellen mit N-Acyl-D-Mannosaminen und nachfolgende LPV- oder BKV-Infektion

BJA-B Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen zu Zellkonzentrationen von  $1 \times 10^6$ /ml für Behandlungsdauern von 3 h und  $2 \times 10^5$ /ml für 48 h Inkubation. Die Konzentration der in PBS gelösten Neuraminsäure-Vorstufenanaloga wurde zwischen 0,01 und 10 mM in Kultur variiert. Monolayerzellen wurden dünn auf Deckgläsern ausgesät, so daß sich ein konfluenter Zellrasen erst nach etwa vier Tagen einstellte. 15

Nach Behandlung mit den Neuraminsäure-Vorstufenanaloga wurden die Zellen in PBS gewaschen und für 3 h bei 4°C mit Impfvirus infiziert. Mit LPV-infizierte BJA-B Zellen wurden dann einmal mit Medium gewaschen und abzentrifugiert, mit BKV-infizierte Vero Zellen wurden dreimal mit Medium gespült. Nach weiteren 48 h in Kultur konnte der Prozentsatz Virus-infizierter Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz bzw. die LPV-Permissivität bestimmt werden. 20

#### 10. Messung von Virus-Bindung und -Infektion 25

##### (i) Bestimmung des Grades der Virusinfektion

Der Grad der LPV-Infektion in Kultur wurde sowohl über eine Bestimmung des Prozentsatzes Virus-Antigen-produzierender Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz (Forbes et al., a.a.O.) als auch über eine Quantifizierung des viralen Hauptstrukturproteins LPV-VP1 mittels ELISA (10.2.3.) relativ zur Gesamtproteinmenge eines Extraktes infizierter Zellen ermittelt. Dieser Quotient (ausgedrückt als ng LPV-VP1 pro mg Gesamtprotein) wird nachfolgend als LPV-Permissivität bezeichnet. 30

Der Grad der BKV-Infektion wurde ebenfalls über indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung eines Kaninchen-anti-BKV-Partikel-Serums bestimmt. 35

##### (ii) LPV-Bindungstest

Die Bindung von LPV-Partikeln an BJA-B-Zellen wurde wie unter 10.3. beschrieben gemessen. 40

#### 10.1. Indirekte Immunfluoreszenz 40

Zur Bestimmung des Prozentsatzes Virus-infizierter Zellen wurden  $5 \times 10^5$  BJA-B-Zellen 48 h nach Infektion abzentrifugiert und in 50 µl PBS resuspendiert ( $1 \times 10^4$  Zellen/µl). 10 µl wurden auf ein Feld eines poly-Lysin-beschichteten Adhäsions-Objektträgers aufgebracht. In einer feuchten Kammer konnten sich die Zellen in 30 min auf den poly-Lysin-beschichteten Untergrund absetzen. Nicht angeheftete Zellen wurden mit PBS abgespült und die Objektträger anschließend in einem "kalten" Aceton/Methanol-Gemisch [im Verhältnis 1 : 1, bei -20°C aufbewahrt] für 5 min fixiert. 45

Vero-Zellen wurden auf Deckgläsern (Durchmesser 10 mm) ausgesät, wuchsen dort an und wurden nach einmaligem PBS-Waschen wie oben beschrieben, fixiert. 50

Die fixierten Zellpräparate wurden mit je 10–30 µl/Feld monoklonalen oder polyklonalen Erstantikörpern bei 37°C in einer feuchten Kammer für 45–60 min inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend in einer mit PBS gefüllten Schale mit Hilfe eines Magnetrührers vorsichtig für 5 min gewaschen. Als Zweitreagentien dienten kommerziell erhältliche Fluorochrom-gekoppelte (FITC, TRITC, LRSC) Antiimmunoglobuline (1 : 50–1 : 100 verdünnt in PBS). Den Zweitreagentien wurde DAPI zur Kernfärbung zugesetzt. Nach einer weiteren 45- bis 60minütigen Inkubation unter Lichtausschluß und nachfolgendem Waschen wurden die Präparate mit einer Elvanol-Lösung [20 g Elvanol (Polyvinylalkohol), 160 ml PBS, 80 ml Glycerin. Die Elvanol-Lösung wurde bei 80°C gehalten bis sich das Elvanol vollständig gelöst hat, dann portionsweise abgefüllt und autoklaviert] und Deckgläsern (24·60 mm) luftblasenfrei eingebettet und bei 4°C lichtgeschützt gelagert. 55

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem Vanox-T-Mikroskop von Olympus, Tokio, Japan, durchgeführt. 60

#### 10.2.1. Extraktion infizierter Zellen zur Bestimmung der LPV-Permissivität

Die Zellen (ca.  $3-4 \times 10^6$ ) wurden 48 h nach Infektion geerntet, in PBS gewaschen und das Zellsediment zur Zellyse für mindestens einen Tag bei -20°C eingefroren. Die Virusextraktion wurde, wie unter 7.1. beschrieben, durchgeführt: Das Zellsediment wurde in 400 µl kaltem "Extraktionspuffer" resuspendiert und unter häufigem Aufwirbeln für 60–90 min auf Eis gehalten, bevor die Zelltrümmer mit 4500 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert wurden. Der Virus-haltige Überstand wurde auf seine Protein- (10.2.2.) und LPV-VP1-Konzentration (10.2.3.) 65

analysiert und daraus die LPV-Permissivität der infizierten Zellen errechnet.

### 10.2.2. Protein-Konzentrationsbestimmung des Zellextrakts

Die Proteinkonzentration des Extrakts infizierter Zellen wurde mit dem "BioRad-Micro-Assay" entsprechend den Herstellerangaben bestimmt. Es wurde ein solches Volumen der Proteinlösung eingesetzt, daß die Blaufärbung derjenigen von 10 oder 20 µg des vom Hersteller mitgelieferten Proteinstandards entsprach. Die genaue Proteinkonzentration der Proben wurde aus der Standardkurve intrapoliert.

### 10.2.3. LPV-VP1-ELISA

Der affinitätsgereinigte mAk 456-1 gegen LPV-VP1 wurde 1 : 10<sup>4</sup> in Kopplungspuffer [0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9,6)] verdünnt und jeweils 100 µl pro Napf einer ELISA-Platte (96-Napf-Platte) zugegeben. Nach Lagerung bei 4°C über Nacht wurden die Platten mit Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween 20) in einem Ultrawash-II-Gerät durchgespült (5 × 300 µl pro Napf), um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Das Blocken noch freier Bindungsstellen wurde mit 200 µl pro Napf einer 0,2%-Gelatine-Lösung in PBS mit 0,1% Natriumazid bei RT für 2 h durchgeführt. Die Platten konnten dann bis zur Benutzung für mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

- (1) Die zu vermessenden LPV-Suspensionen aus extrahierten Zellen wurden in PBS 1 : 2 bis 1 : 2000 verdünnt und 100 µl pro Napf eingesetzt. Aus einer gereinigten LPV-Partikel Präparation (5 µg LPV-VP1/µl) wurde eine Verdünnungsreihe von 12,5 pg bis 1,6 ng LPV-VP1 pro 100 µl pro Napf angesetzt, die Standardkurve diente. Für jede Probe wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Die Inkubation wurde bei 37°C für 60 min durchgeführt.
- (2) Die Platte wurde mit Waschpuffer gründlich gespült (9 × 300 µl pro Napf).
- (3) Das polyklonale Kaninchen-Serum gegen LPV-VP wurde 1 : 2500 in Waschpuffer verdünnt und jeweils 100 µl pro Napf als Zweitantikörper zugegeben. Die Inkubation fand wie oben beschrieben bei 37°C für 60 min statt.
- (4) Die Platte wurde erneut mit Waschpuffer gespült (9 × 300 µl pro Napf).
- (5) Peroxidase-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG wurde in Waschpuffer verdünnt (1 : 5000) und 100 µl pro Napf der ELISA-Platte zugegeben. Die Inkubation fand bei 37°C für 60 min statt.
- (6) Nach erneutem Waschen (wie (2) und (4)) wurden pro Napf 100 µl Substratlösung [9,9 ml 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 6,0), 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat, 2 µl 37% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] zupipettiert. Die im Napf befindliche Peroxidase setzte dieses Substrat um, es entstand eine bläuliche Färbung. Nach 10–20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 µl pro Napf) gestoppt und bei einer Wellenlänge von 450 nm spektrophotometrisch vermessen. Die Berechnung der LPV-VP1-Standardkurve und Umrechnung der OD-Werte der Proben in ng LPV-VP1 wurde mit einem Programm des Photometers Titertek Multiskan Plus MKII von Flow Laboratories, Meckenheim, durchgeführt.

### 10.3. LPV-Bindungstest an BJA-B-Zellen

Gewaschene Zellen (1 × 10<sup>6</sup>) wurden mit gereinigten LPV-Partikeln (10 ng LPV-VP1) für 30 min bei 37°C in 500 µl PBS (2 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml) inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen bei 12 500 rpm für 2 min wurde das ungebundene, im Überstand befindliche Virus im LPV-VP1-ELISA quantifiziert. LPV-Bindung wurde als Prozentsatz des zellassoziierten Virus relativ zur eingesetzten Gesamtvirusmenge (= 100%) bestimmt.

#### Ergebnisse

#### A. Hemmung der LPV-Infizierbarkeit durch Vorbehandlung von BJA-B-Zellen mit N-Propanoyl- oder N-Butanoyl-D-Mannosamin

Bei einer Endkonzentration der Analoga von 10 mM und 48 h Vorbehandlungszeit von BJA-B-Zellen war sowohl der Prozentsatz LPV-infizierter Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz als auch die LPV-Permissivität zwischen 89 und 95% reduziert. Bei gleicher Behandlungsdauer wurde mit 0,4 mM N-Propanoyl-D-Mannosamin eine 50%ige Reduktion der LPV-Permissivität erreicht.

In Zellen, die für 48 h mit 5 mM N-Butanoyl-D-Mannosamin vorbehandelt waren, wurde eine 80%ige Reduktion der LPV-Bindung beobachtet.

#### B. Verstärkung der BKV-Infizierbarkeit von Vero-Zellen durch Vorbehandlung mit N-Propanoyl-D-Mannosamin

Bei einer Endkonzentration von 10 mM und 48 h Vorbehandlung von Vero-Zellen wurde ein Anstieg der Zahl BKV-infizierter Zellen um das Siebenfache erreicht. Behandlung der mit Analogon vorinkubierten Zellen mit Vibrio cholerae Neuraminidase (200 mU/ml, 2 h, 37°C) führte zu einer über 80%igen Reduktion dieser Infizierbarkeit.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Beeinflussung der Replikation des humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) in MT-4-Zellen durch Neuraminsäure-Vorstufen-Analoga (Aminozucker) der vorstehend angegebenen allgemeinen Formel (II).

## 1. Material und Methoden

Die humane T-Zelllinie MT-4, die für HIV-1 hoch-suszeptibel ist (Harada et al., Science, 229 (1985), 563—566), wurde in RPMI 1640 unter Zusatz von 10% Hitze-inaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin, wie oben beschrieben, kultiviert unter Labor-Sicherheitsbedingungen der Stufe L3.

HIV-1 (Stamm HTLV-III<sub>B</sub>)-Impfvirus (Infektiosität:  $1 \times 10^6$  IU/ml) wurde aus dem Überstand infizierter MT-4-Zellen gewonnen wie beschrieben in Popovic et al., 1984 (Science, 224, 497—501). Das HIV-Impfvirus wurde aliquotiert und bei  $-70^\circ\text{C}$  gehalten. HIV-Stamm HTLV-III<sub>B</sub> ist bei der Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 6003 Executive Boulevard, Bethesda, MD 20892 (catalog number 398) erhältlich.

$5 \times 10^5$  MT-4-Zellen wurden in 2 ml Medium in 12-Napf-Platten für eine Behandlungsdauer von 40 h mit N-Acyl-D-Mannosaminen kultiviert. Als Konzentration der in PBS gelösten Neuraminsäure-Vorstufen-Analoga wurden 2,5 und 5 mM in Kultur benutzt. Nachfolgend wurden die Zellen in PBS gewaschen, gezählt und  $1 \times 10^6$  lebende Zellen in 2 ml Medium aufgenommen und mit 100 µl HTLV-III<sub>B</sub>-Impfvirus für 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  infiziert. Nach einmaligem Waschen in 2 ml PBS wurden die Zellen erneut in Medium aufgenommen und für weitere 24 h kultiviert. In Überständen dieser Kulturen wurden mit Hilfe eines ELISA (Vironostika-HIV-Antigen-ELISA-Mikrosystems) nach Herstellerangaben die HIV-1-Antigen-Konzentration bestimmt.

## 2. Ergebnisse

Die Behandlung von MT-4-Zellen mit N-Butanoyl-D-Mannosamin (40 h) führte bei einer Konzentration des Neuraminsäure-Vorstufen-Analogons von 5 mM zu einer Reduktion von HIV-Antigen im Überstand von 97%, bei einer Konzentration des Neuraminsäure-Vorstufen-Analogons von 2,5 mM zu einer Reduktion von HIV-Antigen im Überstand von 85% gegenüber unbehandelten Zellen.

Als Kontrolle diente die Behandlung von MT-4-Zellen mit N-Acetyl-D-Mannosamin (40 h, 5 mM). Hier war die HIV-Antigen-Konzentration im Überstand um 21% gesteigert gegenüber unbehandelten Zellen.

## Angewendete Methoden

## In-vitro-Stimulation von Lymphozyten

Aus heparinisiertem Blut von Tumorpatienten bzw. "buffy coat" von gesunden Probanden wurden periphere Blutlymphozyten (PBL) durch eine Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum gewonnen.

Dazu wurden 15 ml Ficoll-Paque (Dichte: 1,077 g/ml) im Zentrifugen-Röhrchen (50 ml) mit 30 ml Blut, das vorher 1 : 2 bis 1 : 3 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde, vorsichtig überschichtet. Es wurde bei 600 g 30 min zentrifugiert. Bei der Zentrifugation wandern die Erythrozyten und Granulozyten durch die Ficoll-Schicht, während sich die mononuklearen Blutleukozyten unmittelbar über dem Trennmedium anreichern. Diese Zellschicht wurde entnommen, in Kochsalzlösung aufgenommen und fünfmal gewaschen (200 g, 5 min). Anschließend wurden die Zellen in RPMI-1640-Medium mit 10% FKS,  $10^{-5}$  mol/l 2-Mercaptoethanol und 2 mmol/l L-Glutamin aufgenommen und in Plastik-Kulturschalen im Brutschrank 16 h inkubiert, um adhärenente Monozyten abzutrennen. Die Suspension der nicht-adhärenenten, peripheren Blutlymphozyten wurde auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^6$  ml verdünnt.

Zur Überprüfung der Vitalität der Zellen wurde die Trypanblaufärbung angewendet. Zu einer Zellsuspension (20 µl) wurden 80 µl einer 0,1%igen Trypanblaulösung gegeben. Nach Mischung des Testansatzes erfolgte die Auszählung vitaler Zellen in der Neubauer-Zählkammer.

Zur Stimulierung von Lymphozyten wurde Concanavalin A (4 µg/ml) zur Zellsuspension gegeben, eine maximale Wirkung trat nach 72 h ein. Für eine Kurzzeitaktivierung wurde Con A (4 µg/ml) 1 h zur Zellsuspension gegeben. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen (200 g, 5 min).

## Verwendete Zelllinien:

ATCC CCL 86 (Raji)  
ATCC CCL 213 (Daudi)  
ATCC CCL 229 (LoVo)  
ATCC CCL 240 (HL-60)  
ATCC CCL 243 (K-562)  
ATCC CRL 1582 (Molt-4)  
ATCC CRL 1593 (U-937)  
ATCC HTB 22 (MCF-7)  
ATCC HTB 38 (HT-29)

## Aufnahme und Einbau der Wirkstoffe

Die verschiedenen Zuckeranaloga wurden der Zellsuspension in einer Konzentration zwischen 0,05 mmol/l und 50 mmol/l in Mikrotiterplatten zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bis 72 h.

## Bestimmung der Zellproliferation

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Test verwendet. Dieser Test basiert auf der

Bestimmung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaurate in die DNS, die sich proportional zur Zellzahl verhält.

Dazu erfolgte die Kultivierung der Zellen in Mikrotiterplatten. In jede Vertiefung wurden 200  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Zellsuspension gegeben. Jeweils 16 h vor Beendigung der Inkubation wurden zu jedem Testansatz 0,037 MBq  $^3\text{H}$ -Thymidin pro Vertiefung zugesetzt. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension auf Filterplättchen gegeben. Die luftgetrockneten Plättchen wurden je zweimal (30 min) mit 10%iger bzw. 5%iger Trichloressigsäure sowie 50%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die Messung der  $^3\text{H}$ -Thymidinaktivität erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler.

#### Adhäsionsassay an extrazellulärer Matrix

Der Adhäsionsassay wird in 96-well-Mikrotiterplatten durchgeführt, die mit verschiedenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Fibronectin, Vitronectin, Collagen, Laminin) beschichtet sind. In Abhängigkeit der einzusetzenden Zuckeranaloga soll die Adhäsionsfähigkeit von Zellen untersucht werden. Zur Bestimmung der relativen Anzahl gebundener Zellen werden der MTT-Test, der MUH-Test und eine Kristallviolett-färbemethode herangezogen.

Der MUH-Test beruht auf der Hydrolyse des fluorogenen Substrats MUH (4-Methylumbelliferylheptanoat) durch Esterasen (Dotsika et al., 1987).

Der MTT-Test basiert auf der Umwandlung von Tetrazoliumsalz in farbiges Formazan durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien (Alley et al., 1988).

#### Adhäsionsassays an Endothelzellen

Endothelzellbeschichtete Mikrotiterplatten werden mit  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Tumorzellen inkubiert. Zur Bestimmung der relativen Anzahl gebundener Tumorzellen wird die Aktivität des Lysates gemessen.

#### Untersuchung der Modulierbarkeit von Adhäsionsmolekülen

Der Nachweis der Adhäsionsrezeptoren bzw. deren Modulierbarkeit durch Zuckeranaloga erfolgte durch Fluoreszymetrie am FACScan mit monoclonalen Antikörpern.

#### Invasionsassay

Zur Bestimmung des invasiven Potentials von Tumorzellen wurden Boyden-Kammern verwendet, deren obere Kammer mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix beschichtet sind (Repesch, 1989). Der Einfluß synthetischer Zuckeranaloga auf das Migrationsverhalten wurde in dieser Anordnung untersucht.

#### Bestimmung der NK-Zellaktivität

Die Bestimmung der NK-Zellaktivität peripherer mononuklearer Blutleukozyten erfolgte in einem Zytotoxizitätstest mit  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Targetzellen (K562-Zellen). Der Versuch wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung wurde bei verschiedenen Effektor-Targetzell-Verhältnissen (50 : 1, 25 : 1, 12,5 : 1, 6,25 : 1) bestimmt.

Zur Bestimmung der "maximalen Freisetzung" von  $^{51}\text{Cr}$  wurde den Targetzellen anstelle der Effektorzellen Medium mit einem Gehalt von 2% Triton X-100 zugesetzt. Als "spontane Freisetzung" bezeichnet man diejenige Menge an  $^{51}\text{Cr}$ , die die Targetzellen abgeben, wenn anstelle der Effektorzellen lediglich Kulturmedium zugesetzt wird.

Mit Hilfe eines Rechnerprogramms (Pross et al., 1984) für nichtlineare Regressionsanalysen wurden die lytischen Einheiten berechnet. Die Regressionskurve beschreibt die Abhängigkeit der spezifischen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung vom Effektor-Targetzell-Verhältnis und somit von der Menge der Effektorzellen. Mit Hilfe dieser Regressionskurve wurden die lytischen Einheiten bestimmt. Eine lytische Einheit (LU) entspricht derjenigen Effektorzahl, die notwendig wäre, 30% spezifische  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung zu bewirken.

#### Phagozytostest

Monozyten wurden mit Zuckeranaloga behandelt. Als Phagozytosepartikel dienten neben Anti-D-sensibilisierten Erythrozyten Neuraminidase-behandelte Schäferythrozyten. Ein zweiter Teil bewertete die Fähigkeit von Granulozyten, innerhalb von einer Stunde Latexpartikel aufzunehmen.

#### In-vivo-Versuche

Am Beispiel experimenteller Hepatome, insbesondere am Morris-Hepatom 7777, wurde in vivo geprüft, ob es möglich ist, durch Behandlung von Ratten mit Zuckeranaloga und anschließender Injektion von Hepatomzellen deren Wachstum zu hemmen bzw. zu verhindern. Andererseits wurden Hepatomzellen mit Zuckeranaloga behandelt werden und anschließend Ratten appliziert, um deren Tumorstadium zu testen.

#### Literatur

Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker,

R. M., Boyd, M. R.

Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay.

Cancer Res., 48, 589—601 (1988)

Böyum, A.

Separation of Blood Leukocytes, Granulocytes and Lymphocytes.

Tissue Antigens, 4, 269—274 (1974)

Dotsika, E. N., Sanderson, C. J.

A fluorometric assay for determining cell growth in lymphocyte proliferation and lymphokine assays.

J. Immunol. Meth., 105, 55—62 (1987)

Pross, H. F., Marown, J. A.

The standardisation of NK cell assays for use in studies of biological response modifiers.

J. Immunol. Meth., 68, 235—249 (1984)

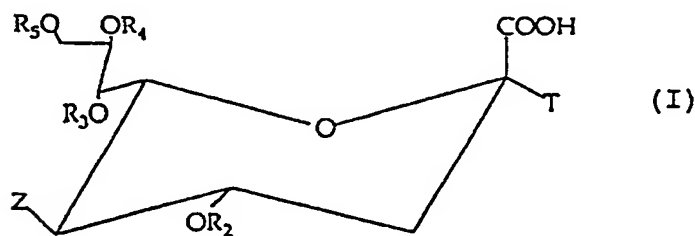
Repesch, L. A.

A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion.

Invasion Metastasis, 9, 192—208 (1989)

## Patentansprüche

### 1. Glycoproteine der allgemeinen Formel (I)



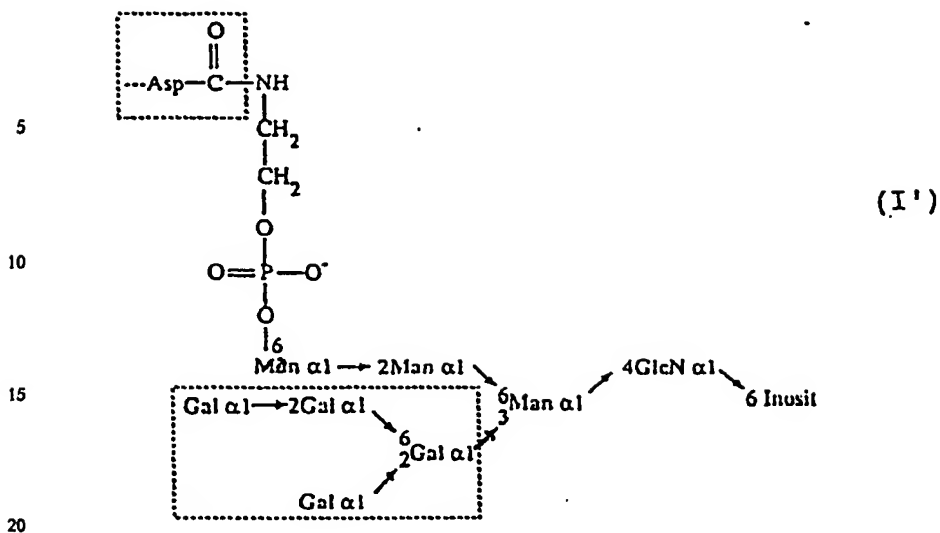
worin bedeuten:

Z — R<sub>1</sub>, —NH<sub>2</sub>, —NHR<sub>1</sub>, —NR<sub>1</sub>R<sub>1</sub>', —N<sup>+</sup>R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'', —OR<sub>1</sub>, —SR<sub>1</sub> oder —CR<sub>1</sub>R<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'',

R<sub>1</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>1</sub>'', R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>5</sub>, die gleich oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoff, einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen (C<sub>n</sub>H<sub>2n+2</sub>, n = 1 bis 20); einen linearen oder verzweigten Alkenylrest mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>, n = 3 bis 20, Position der Doppelbindung an C<sub>n</sub> n = 2 bis 19); einen linearen oder verzweigten Alkynylrest mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen (C<sub>n</sub>H<sub>2n-2</sub>, n = 3 bis 20, Position der Dreifachbindung an C<sub>n</sub> n = 2 bis 19); einen Alkenyl- bzw. Alinylrest mit 2 oder mehr Doppelbindungen bzw. Dreifachbindungen mit 4 bis 20 Kohlenstoffatomen; einen Arylrest mit 6 bis 20 Kohlenstoffatomen; einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Acylrest (—CO—R<sub>1</sub>) mit insgesamt 1 bis 20 Kohlenstoffatomen einschließlich seiner ein- oder mehrfach hydroxylierten Analoga; einen Aronylrest mit 6 bis 20 Kohlenstoffatomen; einen Carbonylamidrest der Formel —CONH<sub>2</sub>, —CONHR<sub>1</sub>, —CONR<sub>1</sub>R<sub>1</sub>' oder —CONR<sub>1</sub>R<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>''; einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Thioacylrest (—CS—R<sub>1</sub>) mit insgesamt 1 bis 20 Kohlenstoffatomen; oder einen Thiocarbamidrest der Formel —CS—NH<sub>2</sub>, —CS—NHR<sub>1</sub>, —CS—NR<sub>1</sub>R<sub>1</sub>' oder —CS—NR<sub>1</sub>R<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'';

wobei jeder der vorgenannten Reste außer H gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert sein kann durch Halogen-, Hydroxy-, Epoxy-, Amino-, Mercaptan-, Phenyl-, Phenol- oder Benzylgruppen, und T einen Mono-, Di- oder Oligosaccharidrest mit bis zu 40 glykosidisch miteinander verknüpften, gegebenenfalls verzweigten Zuckerresten, die Furanose- und/oder Pyranoseringe darstellen und 5 bis 230 Kohlenstoffatome enthalten und N- oder O-glycosidisch an Polypeptide gebunden sind, und

Glycoproteine der allgemeinen Formel (I') für einen Glycosylphosphatidylinosit-(GPI)-Anker



**Gal = Galactose.**

**Asp = Asparagin**

wobei GlcN ersetzt se

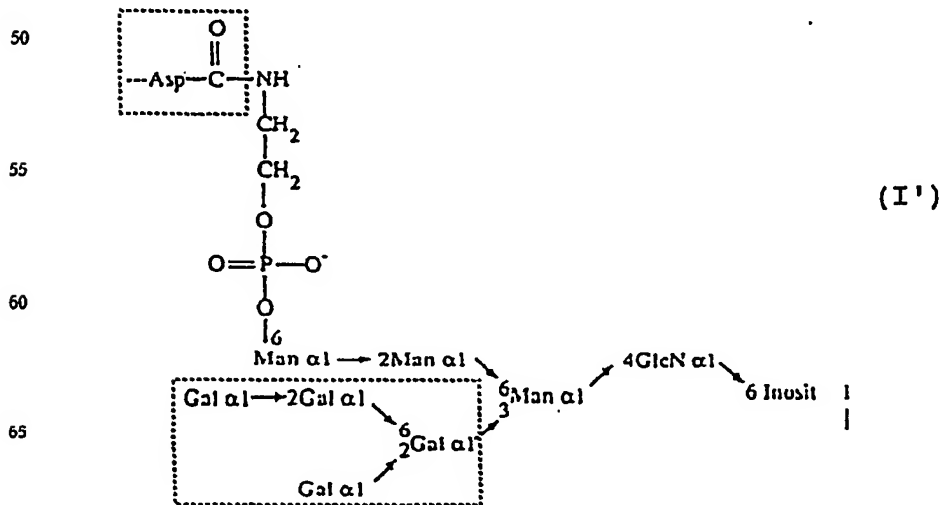
**2. Glycoproteine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) bedeuten:**

$$Z - R_1, -NH_2, -NHR_1, -NR_1R_1', -N^+R_1R_1'R_1'', -OR_1, -SR_1 \text{ oder } -CR_1R_1'R_1'',$$

R<sub>1</sub>, R<sub>1'</sub>, R<sub>1''</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>5</sub>, die gleich oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoff, einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen; einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 3 bis 10 Kohlenstoffatomen; einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 3 bis 10 Kohlenstoffatomen; einen Alkenyl- bzw. Alkylrest mit 2 oder mehr Doppelbindungen bzw. Dreifachbindungen mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen; einen Phenylrest; einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Acylrest ( $-\text{CO}-\text{R}_1$ ) mit insgesamt 1 bis 7 Kohlenstoffatomen einschließlich seiner ein- oder mehrfach hydroxylierten Analoga; einen Aroylrest mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen; einen Carbonylamidrest der Formel  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONHR}_1$ ,  $-\text{CON}_2\text{R}_1$  oder  $-\text{CONR}_1\text{R}_1'\text{R}_1''$ ; einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten Thioacylrest ( $-\text{CS}-\text{R}_1$ ) mit insgesamt 1 bis 7 Kohlenstoffatomen; oder einen Thiocarbamidrest der Formel  $-\text{CS}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CS}-\text{NHR}_1$ ,  $-\text{CS}-\text{NR}_1\text{R}_1'$  oder  $-\text{CS}-\text{NR}_1\text{R}_1'\text{R}_1''$ ;

wobei jeder der vorgenannten Reste außer H gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert sein kann durch Fluor, Chlor, Brom oder Jod, Hydroxy-, Epoxy-, Amino-, Mercaptan-, Phenyl-, Phenol- oder Benzylgruppen, und

T einen Mono-, Di- oder Oligosaccharidrest mit bis zu 40 glykosidisch miteinander verknüpften, gegebenenfalls verzweigten Zuckerresten, die Furanose- und/oder Pyranoseringe darstellen und 5 bis 230 Kohlenstoffatome enthalten und N- oder O-glykosidisch an Polypeptide gebunden sind und Glycoproteine der allgemeinen Formel (I') für einen Glycosylphosphatidylinosit-(GPI)-Anker



worin bedeuten:

Gal = Galactose,

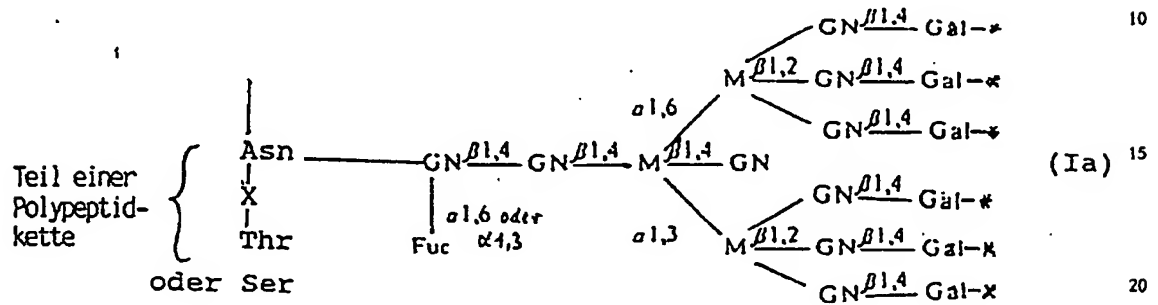
Man = Mannose,

Asp = Asparagin,

GlcN = Glucosamin,

wobei GlcN ersetzt sein kann durch ein Neuraminsäure-Vorstufen-Analogen (Formel II).

3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) T steht für einen Saccharidrest mit N-Glycan-Struktur der Formel (Ia)



worin bedeuten:

Gal = Galactose,

GN = N-Acetyl-D-glucosamin,

M = D-Mannose,

Fuc = Fucose,

Asn = Asparagin,

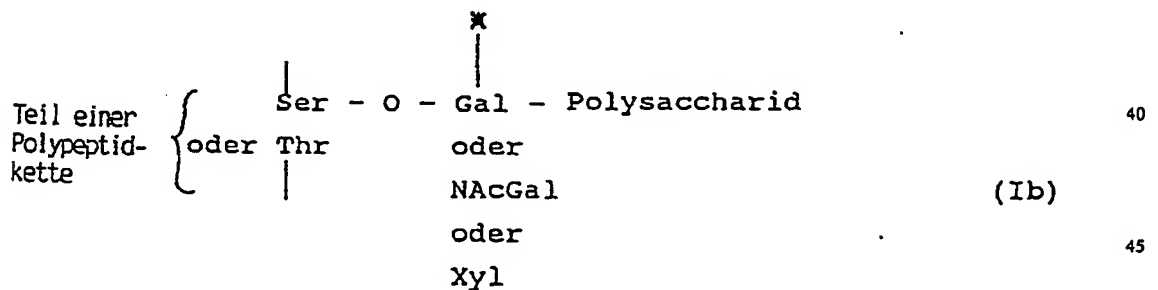
X = eine beliebige Aminosäure außer Prolin,

Thr = Threonin,

Ser = Serin,

\* = T-Verknüpfungsstelle (1 bis 6 Molekülreste),

wobei beide peripheren Reste M durch 1 bis 3 Trisaccharide substituiert sein können; oder für einen Saccharidrest mit O-Glycan-Struktur der allgemeinen Formel (Ib):



worin bedeuten:

Gal = Galactose,

Thr = Threonin,

Ser = Serin,

Xyl = Xylose,

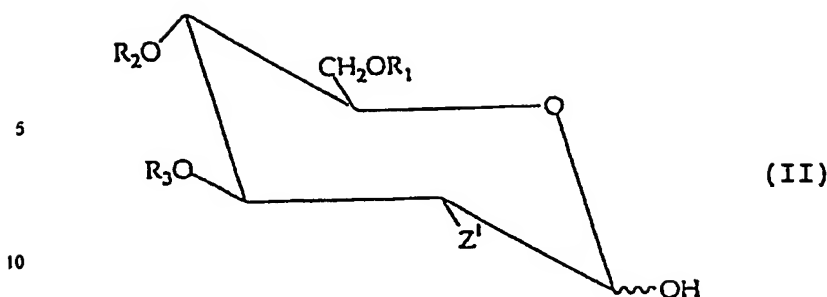
NACGal = N-Acetyl-galactosamin,

\* = T-Verknüpfungsstelle,

wobei in den obigen Formeln (Ia) und (Ib) die Galactose (Gal) ersetzt sein kann durch 2-Desoxy-galactose oder 2-Desoxy-2-halogenid-(F,Cl,Br,I)-galactose.

4. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß dann, wenn T einen Saccharidrest mit N-Glycanstruktur oder einen Saccharidrest mit O-Glycanstruktur darstellt, GN steht für einen Rest der allgemeinen Formel (II):





in der  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen haben und  $Z'$  die gleichen Bedeutungen wie  $Z$  hat und neben der äquatorialen Position auch die axiale Position einnehmen kann, und wobei außerdem bei äquatorialer Position von  $Z'$  der Rest  $-OR_2$  in axialer Position stehen kann.

5. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß  $Z$  bzw.  $Z'$  steht für  $NHR_1$ , worin  $R_1$  den Propanyl-, Butanoyl-, Pentanoyl-, Hexanoyl-, Heptanoyl- oder Crotonoylrest einschließlich seiner ein- oder mehrfach hydroxylierten Analoga darstellt.

6. Verbindungen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_2$  bis  $R_3$  stehen für H oder  $CH_3$ .

7. Verfahren zur in-vivo-Herstellung der Verbindungen nach den Ansprüchen 1 bis 6 durch parenterale oder enterale Verabreichung einer 2-Desoxy-2-amino-mannose, -glucose oder -galactose, deren Aminogruppen durch  $R_1$  substituiert ist, vorzugsweise von N-Propanoyl-, N-Butanoyl-, N-Pentanoyl-, N-Hexanoyl-, N-Heptanoyl- oder N-Crotonoyl-D-mannosamin, an Mensch oder Tier.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die in vivo gebildeten Glycoproteine der Ansprüche 1 bis 6 auf an sich bekannte Weise gewonnen (abgetrennt) werden für den therapeutischen Einsatz.

9. Pharmazeutisches Mittel zur Stimulierung des Immunsystems, insbesondere der T-Lymphozyten, zur Infektabwehr, zur Behandlung von Immunschwächen, Tumorerkrankungen einschließlich Metastasierungsprozessen, Infektionskrankheiten (Viren, Bakterien, Parasiten, Protozoen) und Kreislaufversagen, insbesondere Gefäßverschlüssen und Septikämien bei Mensch und Tier, das als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 7 (Verfahrensprodukt) und 8 (Verfahrensprodukt), gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie üblichen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, enthält.

10. Pharmazeutisches Mittel zur Stimulierung des Wachstums und der Differenzierung von menschlichen und tierischen Zellen des Immunsystems und zur Verhinderung der Adhäsion von Leukozyten, Thrombozyten und Tumorzellen an Gefäßendothelzellen, das als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie üblichen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, enthält.

11. Pharmazeutisches Mittel zur Erhöhung der zytotoxischen Aktivität natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) zur Induktion einer Antitumor-Immunreaktion bei Mensch und Tier, das als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie üblichen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, enthält.

12. Pharmazeutisches Mittel zur Steigerung der Phagozytose-Fähigkeit von Granulozyten und Monozyten zur Induktion einer Antitumor-Immunreaktion bei Mensch und Tier, das als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie üblichen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, enthält.

13. Pharmazeutisches Mittel zur in-vivo-Beeinflussung Neuraminsäure-abhängiger biologischer Prozesse, das als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie üblichen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, enthält.

14. Pharmazeutisches Mittel zur Hemmung der Ligandenbindung an sialylierte Zelloberflächenrezeptoren (Endothelzellen, Thrombozyten, Leukozyten), das als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie üblichen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, enthält.

15. Pharmazeutisches Mittel zur Hemmung der Bindung eines mikrobiellen Pathogens (Virus, Bakterium, Parasit, Protozoon) oder Toxins an die Wirtszelle über einen sialylierten Rezeptor durch in-vivo-Modulation von Neuraminsäuren, das als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie üblichen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, enthält.

16. Pharmazeutisches Mittel zur Behandlung von parasitären Erkrankungen, insbesondere von Trypanosomiasen, Leishmaniasen, Trichomoniasis, Giardiasis, Amöbiasis, Malaria, Pneumozytose, Schistosomiasis (Bilharziose) und Echinokokkose, die als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen sowie üblichen pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen, enthält.

17. Pharmazeutisches Mittel nach einem der Ansprüche 9 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in einer Menge von 0,01 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise von 0,1 bis 20 Gew.-%, insbesondere von 2 bis 10 Gew.-%, enthält.



European Patent  
Office

**SUPPLEMENTARY  
PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number

which under Rule 45 of the European Patent Convention EP 03 73 7755  
shall be considered, for the purposes of subsequent  
proceedings, as the European search report

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (IPC)
X	DE 43 11 580 C1 (REUTTER, WERNER, PROF. DR.MED., 14195 BERLIN, DE) 18 August 1994 (1994-08-18) * abstract; claims 1-17 *	1-33	A61K39/015 A61K39/395 A61P33/00
X	NAIK RAMACHANDRA S ET AL: "Glycosylphosphatidylinositol anchors of Plasmodium falciparum: Molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 192, no. 11, 4 December 2000 (2000-12-04), pages 1563-1575, XP002366830 ISSN: 0022-1007 * abstract *	1-33	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (IPC)
			C07K A61K
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
<b>INCOMPLETE SEARCH</b>			
<p>The Search Division considers that the present application, or some or all of its claims, does/do not comply with the EPC to such an extent that a meaningful search into the state of the art cannot be carried out, or can only be carried out partially, for the following claims:</p> <p>Claims searched completely :</p> <p>Claims searched incompletely :</p> <p>Claims not searched :</p> <p>Reason for the limitation of the search:</p> <p>see sheet C</p>			
Place of search Munich		Date of completion of the search 9 February 2006	Examiner Favre, N
<b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b>			
<p>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</p> <p>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ..... &amp; : member of the same patent family, corresponding document</p>			

1  
EPO FORM 1503 (03.02) (P04C20)



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (IPC)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	
X	VAFAl A: "Boosting immune response with a candidate varicella-zoster virus glycoprotein subunit vaccine" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 13, no. 14, October 1995 (1995-10), pages 1336-1338, XP004057437 ISSN: 0264-410X * abstract *	1-33	
X	WO 00/24406 A (THE WALTER AND ELIZA HALL INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH; SCHOFIELD, LO) 4 May 2000 (2000-05-04) * abstract; claims 1-77 *	1-33	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (IPC)



Claim(s) searched completely:  
1-33

Claim(s) not searched:  
34

Reason for the limitation of the search:

Present claim 34 relate to the use of an agent, which has a given desired property or effect, namely identified/analysed/designed/modified using the method of claim 33. The description does not provide support and disclosure in the sense of Article 84 and 83 EPC for any such agent and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that a meaningful search of the whole claimed subject-matter of the claim could not be carried out (Rule 45 EPC and Guidelines B-VIII, 3).

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT  
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 03 73 7755

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

09-02-2006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4311580	C1	18-08-1994	AT 183204 T 15-08-1999
		AU 6567494 A 08-11-1994	
		CA 2137833 A1 27-10-1994	
		DK 646132 T3 13-03-2000	
		WO 9424167 A1 27-10-1994	
		EP 0646132 A1 05-04-1995	
		JP 8501803 T 27-02-1996	
WO 0024406	A	04-05-2000	EP 1126857 A1 29-08-2001